CORSO INTEGRATO DI GENETICA

a.a.2011-2012

Prof. Pier Franco Pignatti

1.12.2011

Lezioni N.47-48

Mutagenesi e malattie da difetto di riparazione

Neri-Genuardi cap. 10

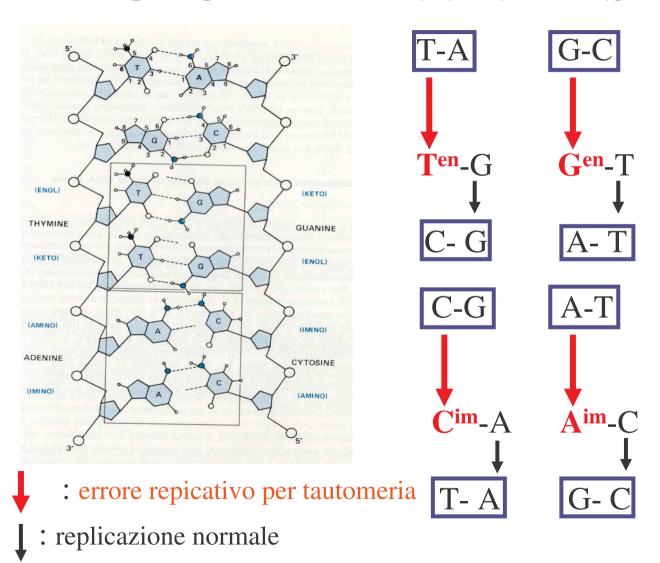
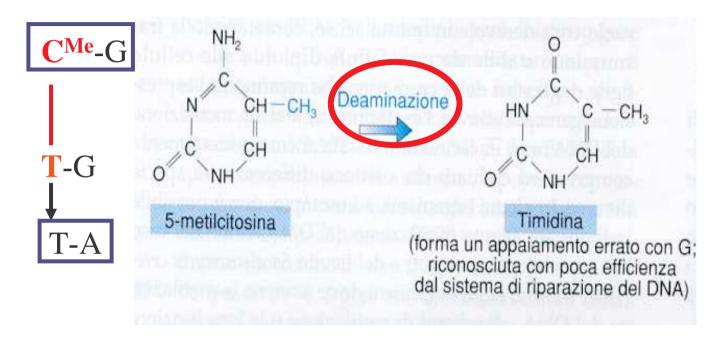
Xeroderma pigmentoso, Atassia teleang., Anemia di Fanconi, S. Bloom, S. Lynch

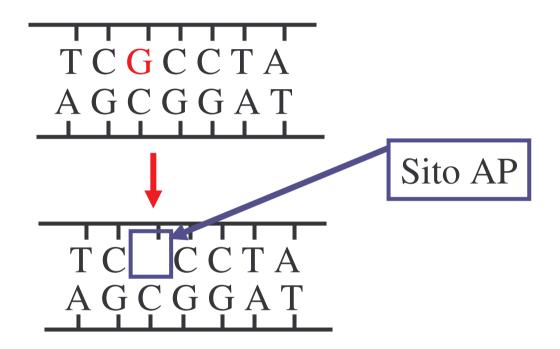
MUTAZIONI SPONTANEE

Avvengono durante la vita normale della cellula, cioè in individui non esposti a mutageni o radiazioni. Costituiscono il materiale usato dalla selezione naturale per l'evoluzione biologica.

Cause possibili: tautomeria, deaminazione, depurinazione delle basi; radicali liberi; errori replicativi, riparativi o ricombinativi

E. Friedberg, DNA Rapair, Freeman 1985

TAUTOMERIA delle BASI

DEAMINAZIONE

Le transizioni C/T rappresentano il 35-50% di tutte le mutazioni puntiformi nell'uomo. Il dinucleotide CpG muta per deaminazione 8,5 volte più dell'atteso: 5^{Me}C è "hot spot" di mutazione (anche C viene deaminata a U, ma il DNA può essere riparato)

DEPURINAZIONE

In condizioni fisiologiche, sono perdute giornalmente circa 5.000 purine per genoma di mammifero per rottura del legame beta-glicosidico

MUTAZIONI INDOTTE

Mutageni fisici

Radiazioni ionizzanti (raggi X, γ, cosmici, radioattività artificiale e naturale), radiazioni UV

Mutageni chimici

Deaminanti, analoghi delle basi, alchilanti, intercalanti, prodotti di pirolisi, sostanze naturali, prodotti sintetici

MUTAGENESI DA RAGGI X

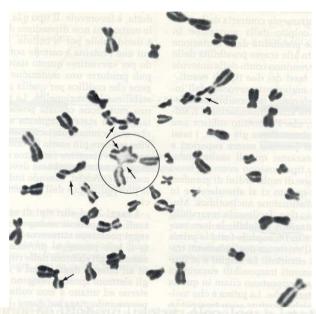



Fig. 11.16. *Cromosomi umani in cui sono visibili le rotture generate (frecce) da 270 roentgen di raggi X. Il cerchio racchiude una struttura prodotta dallo scambio (con saldatura delle rotture) fra due cromatidi; le frecce indicano la posizione delle rotture. In tessuti umani in coltura una dose di appena 20 r è sufficiente per produrre in media una rottura visibile per cellula.*

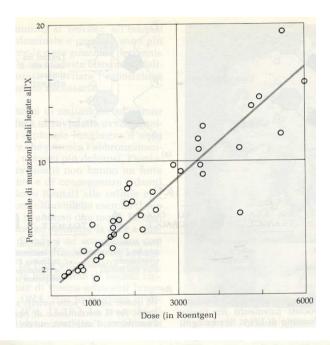



Fig. 11.17. *Grafico che riassume gli studi sull'induzione di mutazioni letali nel cromosoma X di Drosophila da parte dei raggi X. Si noti che la maggioranza dei punti cade vicino alla linea retta; ciò indica che l'induzione delle mutazioni letali è proporzionale alla dose di raggi X, almeno nell'intervallo qui riportato.*

(senza frazionamento di dose)

Hartl. Genetica Umana, Zanichelli 1986

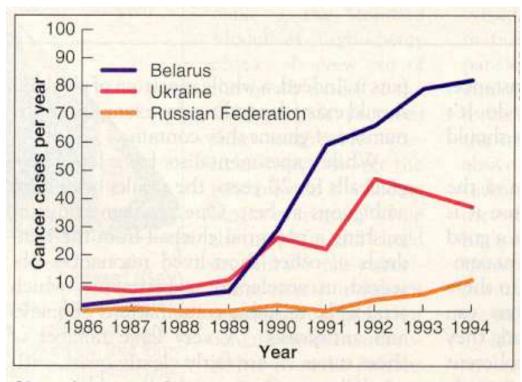
ESPOSIZIONE PRENATALE alle ESPLOSIONI ATOMICHE

TABELLA 11.II. — *Percentuale di bambini con ritardo mentale grave fra quelli che erano stati esposti prima della nascita alle esplosioni atomiche di Hiroshima o Nagasaki* (dai dati della tabella 11.I, soluzione al problema 2 *a*).

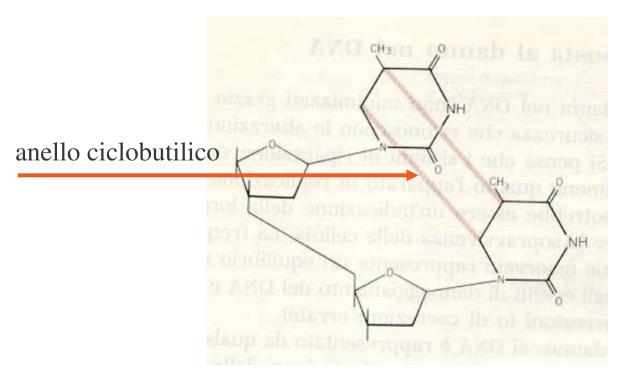
Settimane di vita dal concepimento		Dose di irradiazione (Gy)				
		0-0,01	0,01-0,09	0,10-0,49	0,50-0,99	> 1,0
0-7	% ritardati	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
8-15	% ritardati	0,8	4,3	8,0	30,8	66,7
16-25	% ritardati	0,6	1,2	0,0	13,3	20,0
> 26	% ritardati	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0

8-15 settimane: divisione e migrazione delle cellule nervose nella corteccia cerebrale

Curtoni et al, Manuale di Genetica, UTET 1991

EFFETTI DELL'INCIDENTE NUCLEARE di CHERNOBYL (Aprile 1986)

Sharp increase. Childhoood thyroid cancer is rising in the three republics most affected by Chernobyl.

SCIENCE • VOL. 270 • 15 DECEMBER 1995

EFFETTI DELLE RADIAZIONI UV

Un dimero di Timina è prodotto dalla formazione di legami covalenti fra basi adiacenti

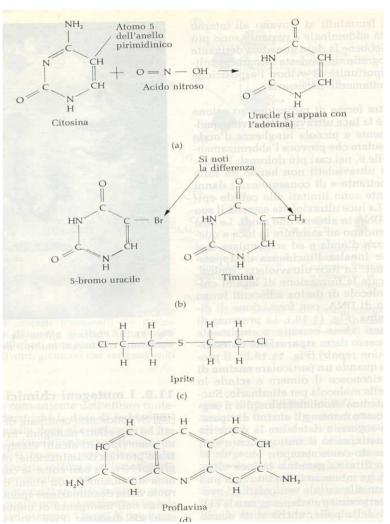
Lewin, Il gene IV, Zanichelli 1992

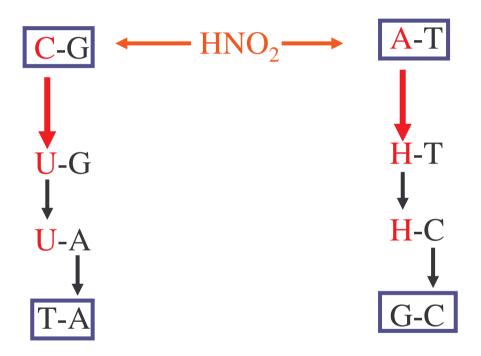
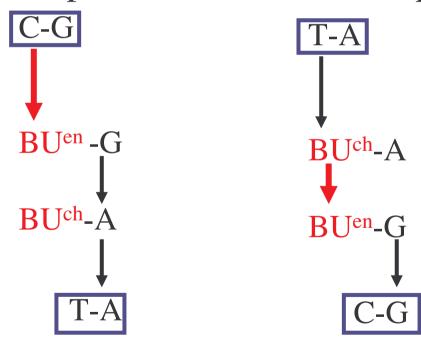
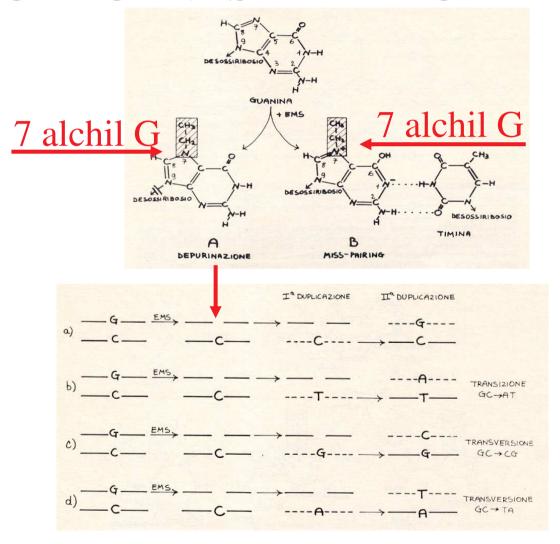
Alcuni MUTAGENI CHIMICI

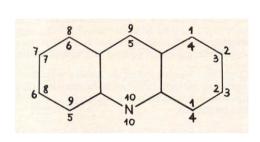
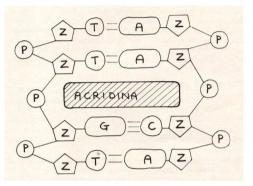
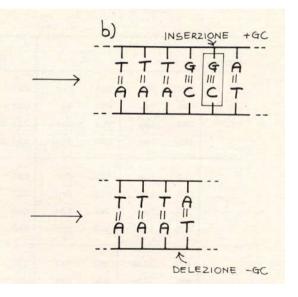
Deaminanti

Analoghi delle basi

Alchilanti

Intercalanti

Hartl, Genetica Umana, Zanichelli 1996

MUTAGENESI DA DEAMINANTI

MUTAGENESI DA ANALOGO DI BASE (BU)

MUTAGENESI DA ALCHILANTI

Magni, Quaderni di Biologia 11, Piccin 1976

MUTAGENESI DA INTERCALANTI

La distorsione della doppia elica dovuta a inserzione di una molecola di acridina porta durante la replicazione a inserzione o delelezione di una singola coppia di basi

Magni, Quaderni di Biologia 11, Piccin 1976

MUTAGENI AMBIENTALI

Sostanze naturali: es. aflatossina

Prodotti di pirolisi: es. cibi cotti, tabacco

Prodotti sintetici: es. additivi alimentari, cosmetici, tinture permanenti capelli, farmaci citostatici e immunodepressivi, insetticidi e fungicidi, erbicidi e fitormoni, casa (ipoclorito sodio), lavoro (cloruro vinile, diossina), atmosfera (formaldeide, fumo di sigaretta)

IL COSTO UMANO DELL'USO DEL TABACCO

Table 1. Deaths from Preventable Causes in the United States in 1990.*

Cause	Estimated No. of Deaths†	Percentage of Total Deaths
Tobacco	400,000	19
Dietary factors and activity patterns	300,000	14
Alcohol	100,000	5
Microbial agents	90,000	4
Toxic agents	60,000	3
Firearms	35,000	2
High-risk sexual behavior	30,000	1
Motor vehicle injuries	25,000	1
Illicit use of drugs	20,000	<1
Total	1,060,000	49

NEJM 330:907, 1994

Table 2. Deaths Attributed to Smoking in the United States in 1990.*

Disease	No. of Deaths
Cardiovascular diseases	179,820
Lung cancer	119,920†
Other cancers	31,402
Respiratory diseases	84,475

*Data were obtained from the Centers for Disease Control and Prevention.[1]

†Includes deaths from environmental tobacco smoke.

Più di 5 milioni di morti/anno: la prima causa di morte prematura prevenibile al mondo

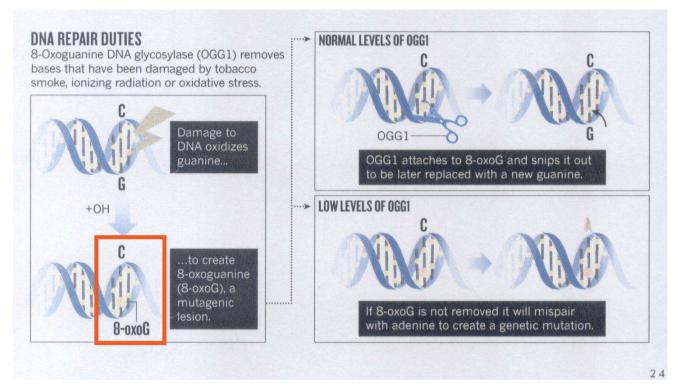
Mathers CD Loncar D 2006

Cancro del polmone

Il fumo di sigaretta è la causa del 90% dei Ca del polmone. E' carcinogeno per la presenza di più di 60 sostanze chimiche che legano e mutagenizzano il DNA. Si formano addotti ingombranti caratteristici alle basi puriniche, come 8-oxoG.

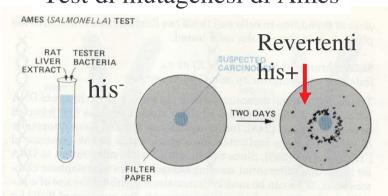
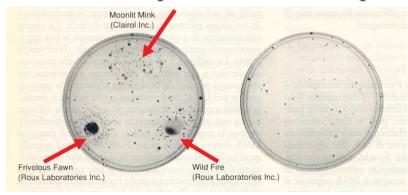
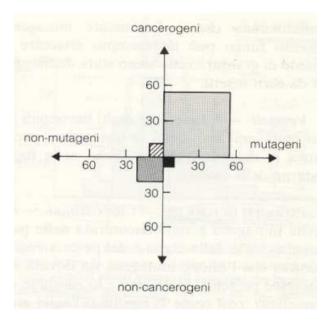
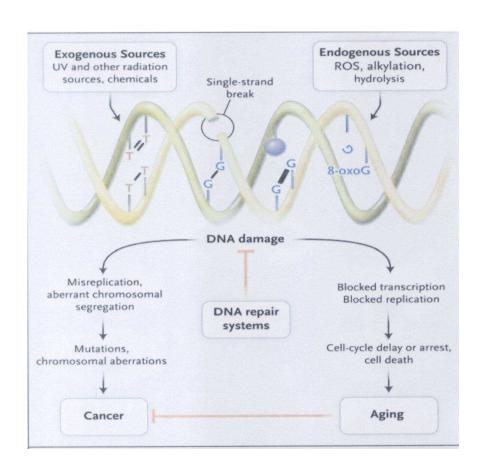
Dallo studio con Next Generation Sequencing (NGS) del genoma di linee cellulari derivate da un tumore polmonare a piccole cellule (SCLC) si deduce che si forma circa una nuova mutazione ogni 15 sigarette fumate

Pleasance ED et al, Nature 2010; Hecht SS, Nature 24.3.2011

Ca polmone: scarsa riparazione di 8-oxoG

Il 40% dei pazienti con Ca polmonare hanno bassa attività OGG1.
I fumatori con bassa attività enzimatica sviluppano Ca polmonare con frequenza 5-10x rispetto ai fumatori con attività normale

Brower V Nature 24.3.2011

MUTAGENI E CANCEROGENI

Test di mutagenesi di Ames

Test di Ames per tre tinture di capelli

Cause e conseguenze del danno al DNA

Hoeijmakers JHJ, DNA Damage, Aging and Cancer, NEJM 2009

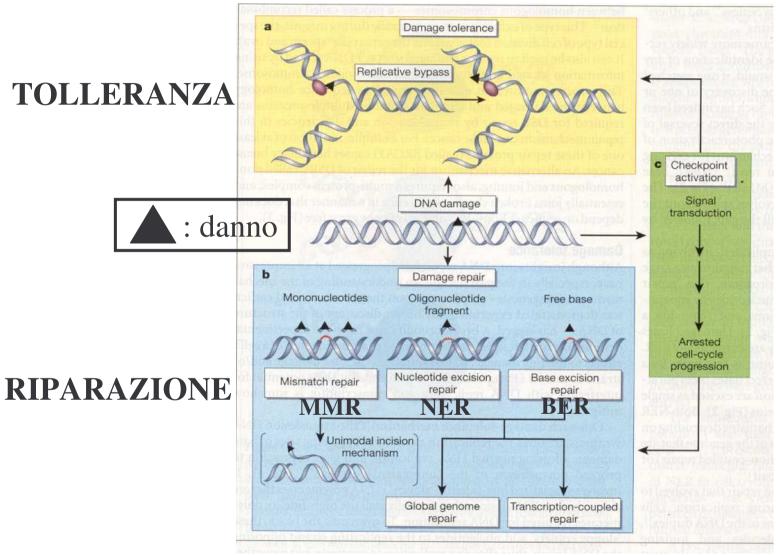
RISPOSTA al DANNO del DNA

Rovesciamento del danno: fotoriattivazione, riparo di O^6-alchilG, inserzione di Pu, legatura di incisione (SSB), riparazione della rottura del doppio filamento (DSB)

Excisione del danno: excisione di base (BER), di nucleotide (NER), accoppiata a trascrizione (TC-NER), da accoppiamento errato (MMR)

Tolleranza del danno: sintesi translesione (TLS)

Friedberg E et al DNA repair and mutagenesis, ASM Press 2006

RISPOSTA AL DANNO DEL DNA

Friedberg, Nature 2003; 421:436

MALATTIE DA DIFETTO DI RIPARAZIONE

TABELLA 9.IX. – *Malattie dell'uomo associate a difetti di riparazione del DNA.* (Modificata da KORNBERG, 1980, p. 622).

(Malattie AR)

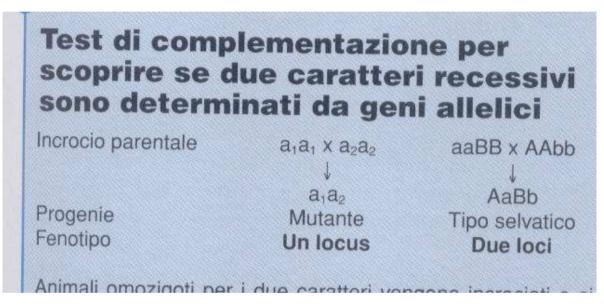
Malattia	Sensibilità	Suscettibilità ad ulteriori malattie	Sintomi	Gruppi Compl.
Xeroderma pigmentosum **XP**	Radiazioni UV, agenti alchilanti	Carcinoma della pelle e melanomi	Ipersensibilità alla luce, lesioni cutanee	9*
Atassiatelangectasia **AT**	Radiazioni gamma	Linfoma	Atassia cerebellare telangectasia, aberrazioni cromosomiche	6
Anemia di Fanconi **FA**	Agenti che formano legami tra filamenti di DNA	Leucemia	Pancitopenia ipoplastica, anomalie congenite	13
Sindrome di Bloom **BS**	Radiazioni UV	Leucemia	Ipersensibilità alla luce, facies caratteristica	1-2

*XP: es. gruppo D (DNA elicasi), E (DNA BP), …

Curtoni et al, Manuale di Genetica, UTET 1991

Test di complementazione

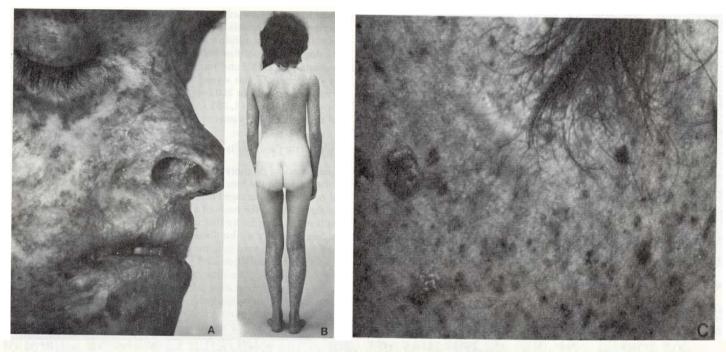
Test di complementazione per scoprire se due caratteri recessivi sono determinati da geni allelici

Incrocio parentale	$a_1a_1 \times a_2a_2$	aaBB x AAbb
	↓	↓
	a_1a_2	AaBb
Progenie Fenotipo	Mutante	Tipo selvatico
	Un locus	**Due loci**

Strachan e Read, Genetica umana molecolare, UTET 2001, p.61

Test per deficit riparazione del DNA: cellule di un paziente sono trasformate con DNA umano normale o estratto da pazienti con altro gene malattia che ripristina fenotipo N

XERODERMA PIGMENTOSUM (XP)

FIGURE 9-1

RR Ca cute: 10.000x

Individuals with xeroderma pigmentosum show severe skin disorders in regions normally exposed to actinic radiation (B). The most prominent of these disorders are extreme dryness (xerosis) and areas of alternating hyper- and hypopigmentation (A, C). The large lesion shown on the left in C is a basal cell carcinoma of the skin. (Courtesy of Dr. K. H. Kraemer.)

Friedberg DNA repair Freeman 1985

Difetto di riparazione in cellule XP

c.normali irradiate   c.XP irradiate

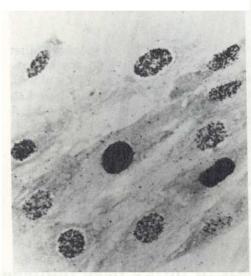
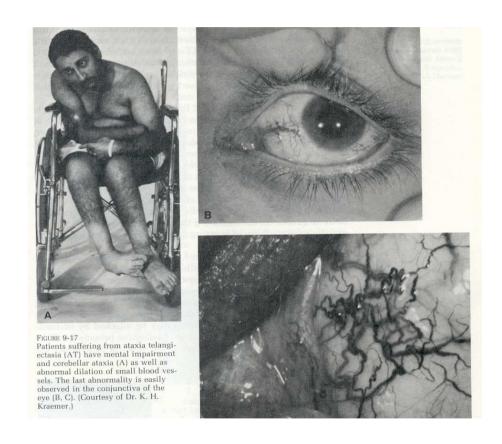



FIGURE 9-3
Normal human fibroblasts (A) in culture show autoradiographic grains in S phase cells and in all cells not in the S phase of the cell cycle. The latter reflects repair synthesis or so-called unscheduled DNA synthesis (UDS) (see Section 5-2) of DNA following exposure to ultraviolet radiation. The cells that are intensely labeled are cells in the S phase of the cycle and are carrying out semiconservative DNA synthesis. Fibroblasts from patients with xeroderma pigmentosum (B) show no detectable UDS in non-S-phase cells, although labeling of S-phase cells is normal. (Courtesy of Dr. J. E. Cleaver.)

Test UDS: in XP non c'è sintesi di DNA in cellule non in fase S

Difetto NER e sintesi translesione

ATASSIA TELEANGIECTASIA (AT)

FIGURE 9-17
Patients suffering from ataxia telangiectasia (AT) have mental impairment and cerebellar ataxia (A) as well as abnormal dilation of small blood vessels. The last abnormality is easily observed in the conjunctiva of the eye (B, C). (Courtesy of Dr. K. H. Kraemer.)

Friedberg, DNA repair, Freeman 1985

Riparazione in Atassia Teleangiectasia

Test crescita cellulare

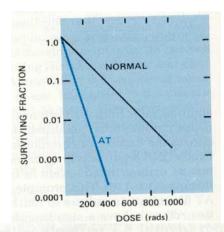



FIGURE 9-18
Fibroblasts from patients with ataxia telangiectasia (AT) are distinctly more sensitive to killing by X-rays than are cells from normal individuals. (After A. M. R. Taylor et al., ref. 117.)

Test incorporazione H^3T

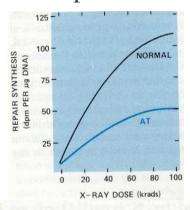



FIGURE 9-19
Cells from some ataxia telangiectasia (AT) patients show a decreased rate and extent of repair synthesis after exposure to ionizing radiation. Repair synthesis was measured by the incorporation of [^{3}H]thymidine under conditions in which semiconservative DNA synthesis was inhibited. (After M. C. Paterson et al., ref. 129.)

Gene ATM (AT Mutated): sensore del danno al DNA.
Difetto di risposta alle rotture del DNA

Friedberg E, DNA Repair, Freeman 1985

ANEMIA DI FANCONI

Figura 10.2. Una bambina di 7 anni affetta da anemia di Fanconi. Notare la bassa statura, la pelle scura, l'assenza del pollice sinistro. L'albero familiare dimostra una tipica ereditarietà autosomica recessiva. (Da Smith DW: Fanconi pancytopenia syndrome. J Pediatr 70: 479, 1967.)

Figura 10.3. Analisi cromosomica di un paziente con anemia di Fanconi. Il gran numero di rotture cromosomiche risulta evidente in questa metafase osservata dopo trattamento con diepossibutano. (Per gentile concessione del Dr. T. Glover.)

Difetto riparazione legami crociati

Gelehrter Collins, Manuale di Genetica Medica, Masson 1992

SINDROME DI BLOOM (BS)

FIGURE 9-24
Patients with Bloom's syndrome typically have light-induced capillary dilatation of the skin of the face in a butterfly distribution. (Courtesy of Dr. James German.)

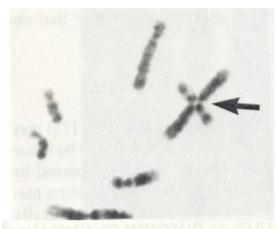
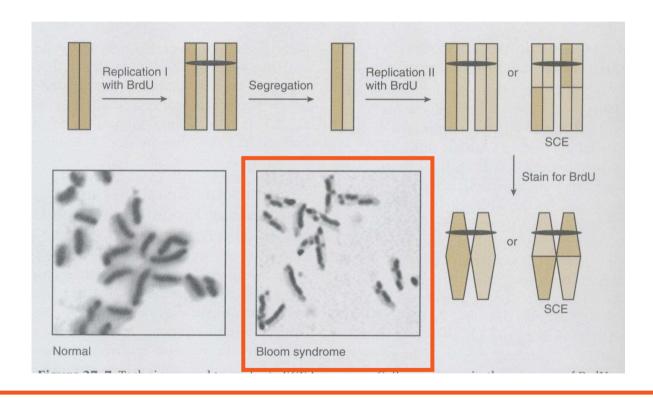



FIGURE 9-26
Cells from Bloom syndrome patients frequently show quadriradial chromosomes (indicated by the arrow), producing a typical cruciform appearance. (Courtesy of Dr. James German.)

Gene BLM: DNA elicasi. Instabilità genomica con aumento della frequenza degli scambi fra cromatidi fratelli o SCE ⟶

Friedberg, DNA repair, Freeman 1985

Scambio di cromatidi fratelli (SCE) in BS

SCE "cromosomi arlecchino" 5-10x in BS

Friedberg E et al DNA repair and mutagenesis, ASM Press 2006

Difetto di riparazione in HNPCC (tumore ereditario non poliposico del colon o S.Lynch)

Tabella 12.6 **Geni coinvolti nella riparazione delle basi male appaiate.**

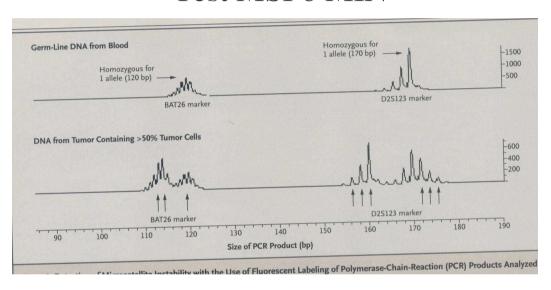
Gene	Numero OMIM	Posizione	Percentuale di HNPCC
MSH2	609309	2p22p21	60%
MLH1	609310	3p21.3	30%
MSH6	600678	2p16	5% (atipico)
MLH3	604395	14q24.3	Raro o assente
PMS1	600258	2q31q33	Raro o assente
PMS2	600259	7p22	Raro o assente

Le mutazioni di *MSH6* (GTBP) sono state soprattutto descritte in donne con cancro dell'endometrio e non del colon.

HNPCC: Difetto MMR (e BER)

Read e Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007

INSTABILITA' dei MICROSATELLITI in HNPCC

Test MSI o MIN

Per il marcatore **BAT26**, ripetizione di 1 n., il tumore ha 1 nuovo allele (doppie frecce) che ha perso circa 5 n. Per **D2S123,** ripetizione di 2 N, 2 nuovi alleli (triple frecce): uno con perdita di circa 10 n. a sin, uno con aggiunta di 2 n. a destra

Lynch HT e A de la Chapelle NEJM 2003

Riparazione del DNA e durata della vita

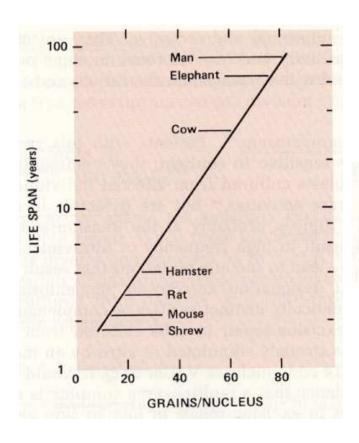



FIGURE 16-9
Correlation between amount of unscheduled (repair) DNA synthesis in young fibroblasts and estimated life span of the species. Synthesis was measured at thirteen hours after exposure to ultraviolet irradiation (20 Jm^{-2}). [After Hart, R. W., and Setlow, R. B. (1974) *PNAS 71*, 2169.]

Kornberg A, DNA replication, Freeman 1980

Sindromi progeroidi e riparazione

Fig. 5.40 Una donna americana di origine giapponese durante l'adolescenza e all'età di 48 anni. Anche altri dei suoi otto fratelli erano affetti dalla sindrome di Werner [1613].

DNA elicasi

La durata della vita è diminuita nelle sindromi progeroidi con invecchiamento precoce e insorgenza prematura di malattie solitamente associate con individui molto più anziani. Malattie con difetto di riparazione del DNA. S.Werner:osteoporosi, aterosclerosi, diabete, capelli bianchi. S.Cockayne:cataratta. TTD:osteoporosi, cataratta, capelli fragili. AT:immunodeficenza, capelli grigi. Durata media della vita: WS 50 anni, CS 12 anni, TTD 10 anni, AT 20 anni.